



TITLE:

Seasonal analysis of histone modifications
in a natural population of *Arabidopsis*
halleri(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Nishio, Haruki

CITATION:

Nishio, Haruki. Seasonal analysis of histone modifications in a natural population of *Arabidopsis halleri*. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-07-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19917>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-10-25に公開

京都大学	博 士（理 学）	氏名	西尾 治幾
論文題目	Seasonal analysis of histone modifications in a natural population of <i>Arabidopsis halleri</i> (ハクサンハタザオ自然集団におけるヒストン修飾の季節解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は生育ステージの遷移タイミングを正確にコントロールするため、植物内部または外部の環境因子の変化を検出する制御システムを進化させてきたと考えられる。そのようなメカニズムはしばしば研究室における実験によって解析されてきたが、自然生育地（つまり <i>in natura</i>）においてはほとんど実証されてこなかった。春化応答（冬の低温による開花促進）は自然状態で顕著に観察される現象であり、これまで人工的な暖温・低温処理によって研究されてきた。シロイヌナズナにおける花成抑制因子である <i>FLOWERING LOCUS C</i> (<i>AtFLC</i>) 遺伝子は春化応答において中心的な役割を果たす制御因子として同定された。シロイヌナズナ属の多年草であるハクサンハタザオの自然集団において、最初の遺伝子発現の <i>in natura</i> 解析となる <i>FLC</i> オルソログ <i>AhgFLC</i> の発現解析が行われた。時系列RT-qPCR解析によって <i>AhgFLC</i> 発現の明確な季節パターンが明らかとなり、過去の気温の長期記憶として働き短期的ノイズを無視する分子メカニズムが存在することが示唆された。しかしながら、植物が気温の長期傾向に応答する分子メカニズムの詳細はいまだ明らかになっていない。シロイヌナズナにおいて、<i>AtFLC</i> 遺伝子座のヒストン修飾は低温処理の異なる段階において特異的なパターンを示し、<i>AtFLC</i> の転写応答を制御すると考えられている。これまで、H3K4me3、H3K27me3を含むクロマチン修飾は、研究室サンプルに対して標準化されたクロマチン免疫沈降（ChIP）法を用いて定量されてきた。</p> <p>本研究において、野外サンプルの解析に適するようなChIPのプロトコールを開発した（第2章）。まず研究室における低温処理前後の2条件、および野外における秋と冬の2季節において、候補となるコントロール遺伝子の検証を行った。次に、野外でのサンプリングおよびサンプル保存を行うための実験条件を示し、これらの条件が通常の実験室サンプルの結果と同様の頑健な結果を与え得ることを示した。そして、この野外用ChIPプロトコール「Field ChIP」を用いて、<i>AhgFLC</i> の <i>in natura</i> クロマチン解析を開始した。<i>AhgFLC</i> 遺伝子座のH3K4me3とH3K27me3の変化パターンを研究室サンプル（低温処理前後）と野外サンプル（秋と冬）で比較したところ、H3K27me3の蓄積領域と量に相違点が存在することが明らかとなり、野外でのさらに詳細なヒストン修飾動態の解析が必要であることが明らかになった。第3章では、ハクサンハタザオ自然集団における <i>AhgFLC</i> 発現、H3K4me3、H3K27me3 レベルの2年間の季節動態を解析した。この長期時系列データに、統計解析、位相差解析、および数理モデリングの手法を当てはめることにより、自然条件下における <i>AhgFLC</i> のエピジェネティック制御の様式を明らかにした。第4章では、RNA発現とヒストン修飾の時間順序および因果関係についての知見を整理し、第3章で示した結果と比較した。これまで植物、酵母において報告されている「転写記憶」メカニズムと本研究において示唆されたH3K27me3による環境の長期記憶システムを比較し、<i>AhgFLC</i> 同様に過去の環境の記憶媒体として機能する「メモリー遺伝子」の特性について議論した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

西尾治幾氏が研究対象とした、ヒストン修飾による遺伝子発現調節は、発生や形態形成を伴うような長期の環境応答において重要であると考えられる。分子レベルでの環境応答メカニズムの研究は、比較的短期の応答を対象にするものがほとんどであり、長期応答の研究は進んでいない。その中で、バーナリゼーション応答に関しては、花成と密接に関係するために、長期の応答が研究されている。そのことを利用し、また、多年草の生活環においては長期応答にもかかわらず可逆的な応答が予想されることに着目し、バーナリゼーションの鍵遺伝子である *FLC (FLOWERING LOCUS C)* を対象としたヒストン修飾と遺伝子発現動態の季節解析研究がなされた。通常、ヒストン修飾を定量するためにクロマチン免疫沈降(ChIP)実験は、室内での研究に用いられてきた手法である。本論文では、自然条件下での季節的環境変化に対する応答を明らかにすることを主眼に置いた長期野外研究がおこなわれた。研究は主に、兵庫県中部のハクサンハタザオ野外集団を対象として進められた。

第1章では、総合序論として、研究の背景と研究システムが記述されている。第2章では、野外サンプルの解析に適するようなChIPのプロトコルを開発した結果が記されている。野外での長時間サンプリング、サンプル量、サンプル運搬などに対して頑健な処理方法を明らかにするとともに、冬前と冬という対照的な野外条件下でも使用することができるコントロール遺伝子を決定した。そして、この野外用ChIPプロトコル「Field ChIP」を用いて、*AhgFLC*のヒストン修飾解析を実施し、野外でのさらに詳細なヒストン修飾動態の解析が必要であることが明らかになった。第3章では、ハクサンハタザオ自然集団における*AhgFLC*発現、H3K4me3、H3K27me3レベルの2年間の季節動態を解析している。2週間毎の約50回にわたる高頻度長期時系列データが得られた。ヒストン修飾の時系列データとしては類を見ない長期データである。そのデータに、統計解析、位相差解析、および数理モデリングの手法を当てはめることにより、自然条件下における*AhgFLC*のエピジェネティック制御の様式が記述された。遺伝子とヒストン修飾動態との間の関係について2種類の効果を設定し、その有無についてモデリングによる推定値と、実際の観察値とが比較検討されている。第4章では、RNA発現とヒストン修飾の時間順序および因果関係についての知見にもとづき、自然の季節環境下における長期環境応答について、H3K27me3による環境の長期記憶システムの役割について議論されている。

本論文により、植物のヒストン修飾についての野外研究が可能となるとともに、H3K27me3による環境の長期記憶システムが植物の季節応答に重要な役割を持つことが示唆された。その結果は、自然条件下における長期環境応答のメカニズムの実証的研究として高く評価できる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年6月9日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。